

La columna bioelectrogénica: una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria

Tristano Bacchetti De Gregoris^{1,a}, Belén Barroeta^{2,b}, Abraham Esteve Nuñez^{1,2,c}

¹Fundación IMDEA Agua, C/. Punto Net 4, 2ª planta, Edificio ZYE, Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá. 28805-Alcalá de Henares. Madrid. España.

²Departamento de Química Física, Química Analítica e Ingeniería Química, Edificio Polivalente, Universidad de Alcalá. 28805-Alcalá de Henares. Madrid. España.

^atristano.bacchetti@imdea.org, ^bbelen.barroeta@uab.es, ^cabraham.esteve@uab.es

[Recibido en marzo de 2014, aceptado en marzo de 2015]

Para transmitir conceptos científicos complejos en un entorno escolar, la utilización de experimentos llamativos representa una herramienta muy útil. En este artículo se presenta la columna bioelectrogénica, un sistema experimental que une la columna de Winogradsky clásica con las más recientes investigaciones en el campo de la microbiología aplicada. A través de su implementación es posible visualizar procesos físicos, químicos y biológicos que forman parte de la enseñanza científica en institutos de secundaria. Además, la columna bioelectrogénica ha sido ideada para demostrar la existencia de bacterias capaces de producir energía eléctrica, un fenómeno que induce curiosidad y estupor, elementos claves para estimular la participación de los estudiantes. Este sistema ha sido presentado en varias actividades de divulgación para estudiantes de secundaria y siempre ha despertado un elevado grado de interés.

Palabras clave: Bioelectrogénesis. Columna de Winogradsky. Ecología microbiana. Bioelectroquímica. Bacterias productoras de la electricidad. *Geobacter*.

The bioelectrogenic column: a tool for bringing microbial ecology and electrochemistry into secondary school

The use of inspiring experimental demonstrations is a fundamental tool for teaching complex scientific concepts in secondary schools. In this article we present the bioelectrogenic column, an experimental system that joins the classic Winogradsky column to the most recent findings in the field of applied microbiology. With this system we can visualise physical, chemical and biological processes that are at the heart of a sound scientific education. Furthermore, the bioelectrogenic column had been designed to demonstrate the existence of bacteria capable of producing electric energy, an astonishing phenomenon that leaves students highly inquisitive, a key for stimulating their participation. This system has been presented in various scientific outreach activities for secondary school, always awakening a strong interest in the audience.

Keywords: Bioelectrogenesis. Winogradsky column. Molecular ecology. Bioelectrochemistry. Electricity-producing bacteria. *Geobacter*.

Introducción

La experiencia práctica es una de las herramientas más poderosas a disposición del profesor para transmitir conceptos científicos. No obstante, debido a la limitación de fondos económicos de los institutos de secundaria, existen numerosos experimentos que emplean medios sencillos para demostrar procesos físicos, químicos y biológicos muy llamativos. En esta misma revista ha sido presentada la columna de Winogradsky (López Pérez 2008), un sistema que explota la formación de distintos gradientes químicos en suelos sumergidos para visualizar la estratificación de bacterias en el perfil edáfico. El objetivo de este artículo es presentar un método sencillo para acoplar la columna con un circuito eléctrico que conecte las capas más profundas con la superficial. La medición de diferencia de potencial e intensidad de corriente permitirá señalar la formación de un gradiente electroquímico, introducir el concepto

de torre de electrones y demostrar que algunas bacterias son capaces de producir corriente eléctrica.

Las condiciones existentes en los suelos inundados, que la columna de Winogradsky reproduce, se pueden encontrar en ecosistemas como arrozales, humedales (marismas, pantanos y turberas), suelos compactados e inundados por las lluvias, además de en los sedimentos marinos, lacustres y de río, que juntos ocupan el 75 % de la corteza terrestre. En estos ambientes, el oxígeno se agota rápidamente por la respiración heterótrofa, así que nos encontramos en condiciones anóxicas a tan sólo unos pocos milímetros de la superficie. Debido a esta deficiencia de oxígeno, aquellos organismos que habitan estos ambientes deben ser capaces de sobrevivir respirando compuestos distintos del O_2 . En este caso, los microorganismos anaerobios y facultativos pueden respirar aceptores de electrones como el nitrato, hierro férrico (III), óxido de manganeso (IV), sulfato y dióxido de carbono para producir energía y biomasa (Madigan *et al.* 2010). Los resultados de estas reacciones son especies reducidas que a su vez pueden actuar, al oxidarse, como donadores de electrones para el metabolismo de otras especies microbianas. Por este motivo se habla de ciclo de los elementos, y para comprenderlo es importante conocer la naturaleza de algunas reacciones químicas básicas.

En las reacciones redox, una especie (el agente reductor o donador de electrones, que en la reacción se oxida) pierde electrones, mientras que la otra especie (el agente oxidante o aceptor de electrones, que se reduce) los acepta. La tendencia de las especies químicas a adquirir electrones se llama potencial de reducción, y la diferencia de potencial entre las especies que intervienen en estas reacciones es proporcional a la espontaneidad con la que la reacción tiene lugar. En otras palabras, la diferencia de potencial es proporcional la espontaneidad (energía libre de Gibbs) con que un electrón se transfiere de un compuesto a otro, de forma que las células son capaces de transformar la espontaneidad de esa reacción en energía química útil para sus procesos metabólicos. El oxígeno es el aceptor de electrones más común en aquellos seres vivos que habitan la superficie terrestre. Con aproximadamente +800 mV de potencial redox es aquel con mayor potencial redox, y por eso genera mayor rendimiento energético para los organismos capaces de utilizarlo (Bettenbrock *et al.* 2014). Un ejemplo clásico es el proceso de la respiración celular que ocurre en las mitocondrias, donde los hidratos de carbono son completamente oxidados a CO_2 gracias a la presencia del oxígeno que actúa como aceptor de electrones reduciéndose a agua. La fórmula de la reacción es la siguiente:



En términos generales, cuando falta el oxígeno los microorganismos son capaces de utilizar distintos aceptores finales de electrones eligiendo, en cada momento, lo que les permite un mayor rendimiento energético. De esta forma, la teoría de la torre de electrones nos ayuda a dar un orden a la utilización del aceptor de electrones para la respiración. Los aerobios estrictos no pueden vivir sin oxígeno, mientras para los anaerobios el mismo O_2 es tóxico. Sin embargo, los anaerobios facultativos pueden vivir en condiciones aerobias y anaerobias. Entre los dos extremos, ambientes clásicamente clasificados anaerobios o anóxicos, existen microorganismos adaptados para respirar oxígeno en muy distintas concentraciones, por lo que la clasificación clásica no termina de representar la biodiversidad microbiana en los ecosistemas. En términos generales, podemos simplificar la cuestión aceptando que si el oxígeno es abundante, tienden a utilizarlo; si no, pasan a utilizar otros aceptores presentes en los ambientes naturales como el nitrato, el sulfato o el hierro.

En el experimento clásico de la columna de Winogradsky, al sedimento se le añade una fuente de hidratos de carbono (generalmente papel) y de sulfatos (yema de huevo cocido). El conjunto se inserta en una botella, se cubre de agua y se cierra (López Pérez 2008). Como

consecuencia de la actividad de los microorganismos, se establecen dos gradientes químicos de oxígeno y sulfuro (figura 1), con los que históricamente se ha explicado la ecología microbiana de la columna (Madigan *et al.* 2010). Otra clave de lectura es el potencial óxido-reductor que caracteriza cada capa de suelo y que es el resultado de los gradientes químicos mencionados. Este potencial es un indicador de la energía disponible para las bacterias, y es menor en las zonas más profundas del sedimento y mayor cerca de la superficie.

En los microorganismos cada reacción bioquímica es catalizada por una enzima específica pero esto no significa que todos los microorganismos sean capaces de realizarlas todas. Es decir, cada bacteria tiene en su genoma los códigos para sintetizar muchas enzimas, pero no todas las posibles, y su capacidad metabólica será el resultado de las reacciones catalizadas por sus enzimas. De esta forma, por ejemplo, sólo las bacterias capaces de producir las macromoléculas necesarias para convertir la energía solar en energía química hacen la fotosíntesis. Esta especificidad metabólica hace que cada especie prolifere solo en aquellos ambientes que le proporcionan todas las condiciones y nutrientes que necesitan. Por esto, en la columna de Winogradsky las bacterias forman agregaciones claramente visibles ya que cada especie se multiplica en aquella zona del sedimento donde haya condiciones adecuadas.

Las reacciones catalizadas por una bacteria ocurren en general dentro de la célula, de manera que los compuestos químicos tienen que atravesar la membrana celular. No obstante, en los últimos años se ha descubierto que algunas especies son capaces de utilizar compuestos insolubles que son incapaces de acceder al interior de la célula (Stams *et al.* 2006). Entre ellos destaca uno por su abundancia relativa en la naturaleza: el hierro. En su forma oxidada (Fe^{3+}) precipita formando óxidos de hierro insolubles repartidos por toda la corteza terrestre. El potencial redox de estos óxidos de hierro es tan positivo que algunas bacterias han desarrollado un sistema de transporte de electrones para atravesar la membrana celular y consigue reducirlos y con ellos respirarlos de la misma forma que otros microorganismos respiran el oxígeno. El organismo modelo en que se estudia este proceso son las bacterias del género *Geobacter*, unos microorganismos que se encuentra en ambientes naturales como sedimentos, suelos y aguas subterráneas (Lovley *et al.* 2004). *Geobacter* es capaz de reducir materiales insolubles como los óxidos metálicos a través del contacto directo, y con ello obtiene una importante ventaja competitiva en lugares donde los aceptores finales de electrones solubles como el oxígeno o el nitrato son escasos. No es la única bacteria que tiene esta capacidad pero el análisis exhaustivo de distintos ambientes sedimentarios ricos en hierro ha demostrado que es el género predominante.

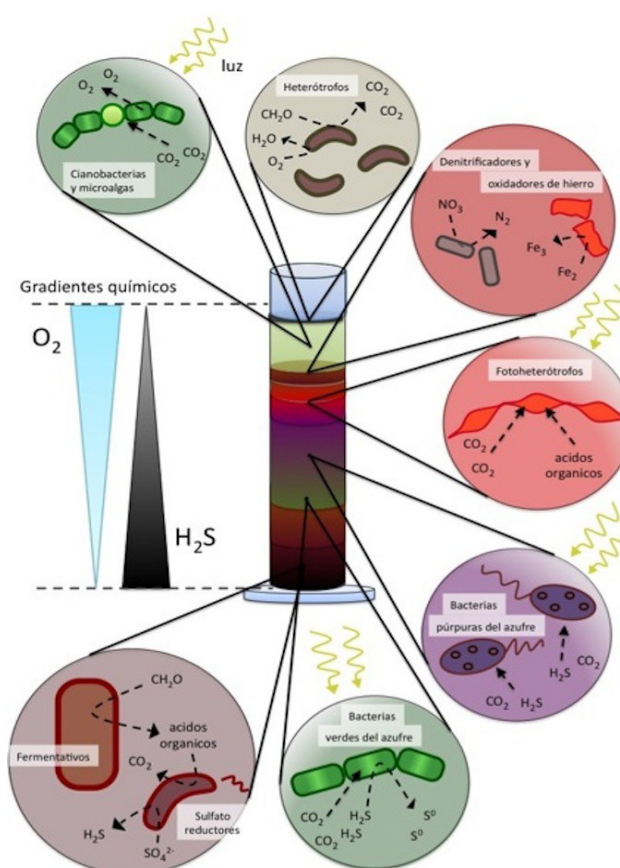


Figura 1. Poblaciones microbianas, con sus metabolismos, en la columna de Winogradsky.

La capacidad que *Geobacter* y otras especies bacterianas tienen de ceder electrones a compuestos extracelulares ha sido explotada en los últimos años para producir electricidad. Esto es posible cuando los electrones generados en la degradación de la materia orgánica son transferidos a un material conductor eléctrico (electrodo). Al fin y al cabo, la corriente eléctrica es simplemente un flujo de electrones que pasa a través de un conductor, sometido a un potencial. Si imaginamos un cable de cobre, para que circule la corriente necesitamos dos cosas: una fuente de electrones y un sistema que genere una diferencia de potencial entre las dos extremidades del cable. Esto último ocurre porque los electrones son cargas negativas y se mueven hacia potenciales positivos. Utilizando la analogía de un salto de agua, la diferencia de potencial entre las extremidades sería equivalente a la altura de ese salto de agua, mientras que la corriente eléctrica sería el volumen de agua por segundo que está pasando. Entre la materia orgánica de la que se alimentan las bacterias y el material conductor (electrodo) existe suficiente diferencia de potencial para que ese salto de agua electroquímico suponga un beneficio energético a la bacteria y otro para nosotros al poder utilizar la corriente eléctrica (Lovley 2012).

Volviendo a la columna de Winogradsky, hemos visto cómo las capas más profundas tenían potenciales redox menores que las más superficiales, debido a las diferencias químicas en los distintos microambientes del suelo. Esta diferencia de potencial que existe entre capas se puede explotar para generar la fuerza electromotriz.

En la práctica, un cable eléctrico pelado en sus extremidades y posicionado en vertical a lo largo del perfil del sedimento sería capaz de conectar eléctricamente el fondo del sedimento con la superficie. Una vez generada esta diferencia de potencial en el cable, especies como *Geobacter* y afines cederán electrones al extremo del cable situado en el fondo del sedimento con el objetivo de producir la energía necesaria para su metabolismo. Para que el circuito eléctrico funcione sólo hace falta que los electrones circulen desde el extremo del cable hasta el otro, donde puedan emplearse en reducir compuestos químicos allí presentes. Así como *Geobacter* puede ceder electrones al cable por contacto, otras bacterias son capaces de aceptar electrones desde el cable. De esta forma otras especies como *Desulfobulbus propionicus*, son capaces de tomar electrones desde el cable y pasarlo al oxígeno, reduciéndolo a agua. En la práctica, esta especie se puede utilizar la electricidad como donador de electrones, transformando la diferencia de potencial entre el cobre y el oxígeno en energía química. *Et voilà!* Con un sistema sencillo como la columna de Winogradsky hemos demostrado la existencia de bacterias capaces de producir electricidad y otras capaces de aceptarla y conectarla con reacciones biológicas. Todos los procesos electroquímicos implicados se resumen en la figura 2. Se trata de una manera inesperada de mostrar a los estudiantes reacciones ambientales que afectan a los ciclos de los elementos, la distribución de los microorganismos en los ambientes según sus requerimientos metabólicos y la existencia de bacterias electrogénicas.

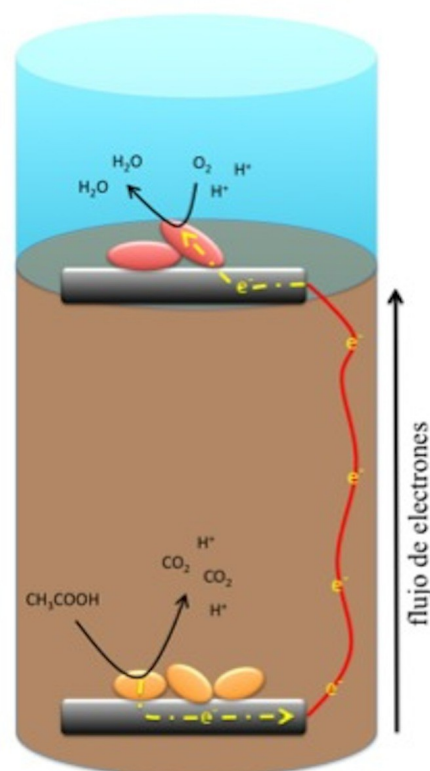


Figura 2. Reacciones de óxido reducción llevadas a cabo por poblaciones electrogénicas pegadas al ánodo (abajo) y al cátodo (arriba).

Materiales

- cilindro de vidrio o botella de plástico transparente
- lodo de una charca o sedimento de un río
- agua
- fuente de carbono (papel)
- sulfato (CaSO_4 o yemas de huevos cocidos)
- tampón de pH (CaCO_3)
- electrodos de carbono (minas de lápices)
- cable eléctrico de cobre
- pegamento de alambre (resina epoxy)
- resina aislante
- resistencia de $1\text{ k}\Omega$
- multímetro

Montaje

En primer lugar hay que preparar el circuito eléctrico para que esté listo para el día de puesta en marcha del experimento. Las minas de lápices están hechas de grafito, un material a base de carbono con propiedades conductoras de la electricidad, que especies como *Geobacter* son capaces utilizar como aceptores de electrones. También podrían valer otros materiales de carbono; cuanto mayor sea su ratio superficie/volumen, más posibilidades de contacto con células microbianas en el suelo. La mina se conecta al cable de cobre utilizando el pegamento de alambre que permite el libre paso de electrones entre el carbono y el cobre. Una vez pegados, es aconsejable aislar las zonas de cobre que han quedado expuestas, porque de lo contrario pueden oxidarse por acción de los microorganismos y disolverse con el tiempo, rompiendo el contacto eléctrico. Esto se puede llevar a cabo con una resina aislante que se aplica sobre la resina conductora, tal como se ilustra en la figura 3. Hay que repetir estas operaciones en las dos extremidades de un cable de suficiente longitud; siempre se puede recortar una vez terminado el montaje de la columna. Las dos minas de grafito representan nuestros electrodos: uno actuará como ánodo, aceptando los electrones que entran al circuito, y otro actuará de cátodo, cediendo los electrones a algún aceptor soluble, normalmente el oxígeno.



Figura 3. Mina de lápiz (grafito) pegada al cable.

Una vez terminado el circuito eléctrico, se trocea el papel para obtener un buen puñado de tiritas pequeñas que serán mezcladas con parte del sedimento, al que también se añaden 3-4 gramos de sulfato de calcio o las yemas de huevos y el carbonato cálcico. El papel está hecho de fibras vegetales y las bacterias celulolíticas son capaces de comerse estas fibras, generando como residuo de sus propios metabolismos productos de fermentación, como los ácidos orgánicos (lactato, acetato...). Preparada esta mezcla, se vierte en la botella hasta llegar a unos 4-5 cm desde el fondo. En la superficie de esta primera capa se coloca un electrodo, que se cubre con el resto de la mezcla de suelo hasta cubrir un tercio de la botella más o menos.

Como hemos visto, el sulfato añadido es utilizado como aceptor final de electrones por las bacterias sulfato reductoras, que utilizan los ácidos orgánicos como donadores de electrones y generarán sulfhídrico (H_2S) y anhídrido carbónico (CO_2) como residuo. Por encima del sedimento ponemos una capa hecha únicamente de suelo, llegando a la mitad de la botella. En esta zona, el sulfhídrico proveniente de las capas de abajo será utilizado por las bacterias del azufre, capaces de cumplir la fotosíntesis anoxigénica a partir de la luz y la ruptura del H_2S . En los últimos milímetros de esta capa colocamos el segundo electrodo, que tendrá que estar muy cerca de la superficie para maximizar la concentración de oxígeno. Hay que asegurarse de que el cable eléctrico sobresalga de la botella para efectuar las mediciones electroquímicas.

Por último, añadiremos el agua hasta rellenar casi por completo la botella y la cerraremos con una capa de parafilm (plástico de parafina) sujeto por una goma elástica.

Si la dejáramos así, el sistema funcionaría. Los aspectos relacionados con la columna de Winogradsky clásica se pondrían en marcha y al cabo de un par de meses las bacterias habrán crecido lo bastante para verlas sin ayuda de un microscopio. Por otra parte, el circuito eléctrico estaría en la condición llamada de corto circuito, en el que nada frenaría el paso de los electrones en el momento que se genere la diferencia de potencial necesaria para moverlos. No obstante, en esta configuración no tendríamos medios para comprobar la existencia de este flujo de electrones. Por esta razón necesitamos hacer un último cambio al circuito eléctrico que nos permita medir tanto la diferencia de potencial que se genera como la intensidad de corriente producida por las bacterias electrogénicas. Para ello, cortamos en un punto el cable que sale de la botella y quitamos unos 2-3 cm del revestimiento aislante de cada extremidad. Enroscamos los dos cables pelados a una resistencia (de $1\text{ k}\Omega$ es suficiente), de modo que los electrodos vuelvan a estar conectados entre ellos a través de la resistencia misma. Con este último ajuste el sistema está completo y sólo hace falta esperar que el tiempo siga su curso (figura 4).

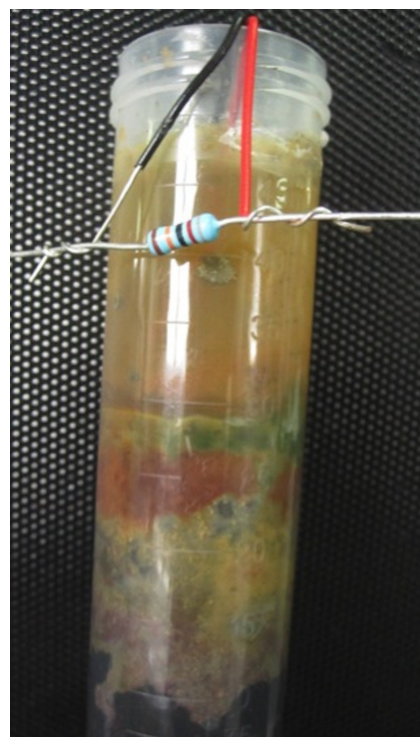


Figura 4. La columna bioelectrogénica, tres meses después de su montaje.

Medidas electroquímicas relevantes para comprender el sistema

Una vez montado el sistema con un multímetro podemos medir como aquel se va modificando a lo largo del tiempo. La primera variable que nos interesa es la diferencia de potencial que se genera entre los dos electrodos. En general, se asigna al polo positivo (cátodo) el color rojo y al polo negativo (ánodo) el color negro. La teoría nos sugiere que en la columna el cátodo es el electrodo superficial, porque ahí se generará un potencial redox más positivo, por la presencia de oxígeno, que en las capas más profundas del sedimento es consumido por las bacterias. Cada vez que queremos medir la diferencia de potencial es necesario desconectar la resistencia y dejar que el sistema se equilibre durante 3-4 horas antes de utilizar el multímetro. Entonces, conectamos el cable rojo del multímetro al cable pegado al electrodo superficial y el cable negro, al que está sumergido; de esta forma medimos el llamado potencial de circuito abierto. En el momento del montaje de la columna lo normal es que este potencial sea alrededor de cero, porque en este momento las condiciones son bastante uniformes. Si cada semana repetimos esta medida, veremos cómo la diferencia de potencial

aumenta con el tiempo por efecto de los cambios químicos y de las actividades microbianas. Al cabo de un mes es probable que el potencial haya llegado a un valor de 500 mV, y que se mantenga así por mucho tiempo, puesto que la columna es un sistema que se autorregenera. Este valor se debe a la diferencia entre las especies químicas en torno a los electrodos, y a los metabolismos microbianos responsables de transformarlos.

La otra medida de interés es la intensidad de corriente, que es equivalente a la cantidad de electrones que pasan por el circuito. Como hemos visto, estos electrones son generados por las bacterias electrogénicas presentes en el suelo. Por lo tanto, la corriente que pasa será proporcional al número de células pegadas al ánodo y a su actividad metabólica. En la práctica, cuanto más alimento esté disponible, más electrones se generarán, y como hemos visto, la comida de las bacterias electrogénicas son los ácidos orgánicos producidos por parte de las bacterias que fermentan el papel añadido al suelo. Por último, la intensidad de corriente generada también es proporcional a la superficie de los electrodos, al material del que están hechos y a las reacciones que permiten la salida de electrones al cátodo. Estas últimas son catalizadas por parte de microorganismos que, en la práctica, se están nutriendo de los electrones provenientes de las capas más profundas. En general, la intensidad de corriente generada es muy pequeña, del orden de los microamperios, pero es posible medirla con el multímetro. Para eso es suficiente conectar los cables del aparato a las dos extremidades de la resistencia mientras esté interpuesta a los electrodos. Lo normal es que, una vez que se genera en el circuito la fuerza electromotriz dada por la diferencia de potencial, la intensidad de corriente aumente hasta llegar al límite constituido por la velocidad con que las bacterias respiran los electrodos.

Referencias

- Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P. (2010) *Brock Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, NJ. Pearson Prentice Hall.
- Bettenbrock K., Bai H., Ederer M., Green J., Hellingwerf K. J., Holcombe M., Kunz S., Rolfe M. D., Sanguinetti G., Sawodny O., Sharma P., Steinsiek S., Poole R. K. (2014) Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. *Advances in Microbial Physiology* 64, 65-114.
- López Pérez J. P. (2008) La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 5 (3), 373-376.
- Lovley D. R. (2012) Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology* 66, 391-409.
- Lovley D. R., Holmes D. E., Nevin K. P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* 49, 219-286.
- Stams A. J., de Bok F. A., Plugge C. M., van Eekert M. H., Dolfig J., Schraa G. (2006) Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology* 8 (3), 371-382.